

THESIS

MUNICH

1966

7

Autoradiographische Untersuchungen
während der experimentellen Carcinogenese
im Respirationstrakt des Goldhamsters
durch Behandlung mit Diäthylnitrosamin

BALDUR WIEBECKE

München

1966

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

Aus dem Pathologischen Institut der Universität München
Direktor: Prof. Dr.W.Büngeler

Autoradiographische Untersuchungen
während der experimentellen Carcinogenese
im Respirationstrakt des Goldhamsters durch
Behandlung mit Diäthylnitrosamin

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Baldur Wiebecke
aus München

München 1966

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
München

Berichterstatter:	Herr Prof.Dr.W.Dontenwill
Mitberichterstatter:	Herr Prof.Dr.W. Büngeler
Dekan:	Herr Prof.Dr.R. Zenker
Tag der mündlichen Prüfung:	21. 6. 1966

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	3
II. Aufgabenstellung	5
III. Methodik	6
a. Theoretische Erläuterungen	6
b. Durchführung der Versuche	8
IV. Ergebnisse	10
V. Diskussion	18
VI. Zusammenfassung	20
VII. Literaturverzeichnis	22

I. Einleitung.

Nach der Entdeckung der carcinogenen Wirkung des Dimethylnitrosamins durch MAGEE und BARNES 1956 (1) fanden SCHMÄHL, PREUSSMANN und HAMPERL (2) im Diäthylnitrosamin (DÄNA) eine besonders geeignete Substanz zur sicheren und raschen experimentellen Carcinomerzeugung.

Oral verabfolgtes Diäthylnitrosamin bewirkt bei Ratten zu 100% hepatocelluläre Carcinome und je nach Versuchsdauer und Dosierung auch Nierentumoren und Plattenepithelcarcinome des Ösophagus (DRUCKREY, SCHMÄHL, DISCHLER und SCHILDBACH, 3).

Goldhamster reagieren auf DÄNA zuerst und zu fast 100% mit Tumoren des Respirationstraktes. Neben Tumoren der Trachea und der Bronchien (DONTENWILL und MOHR, 4, DONTENWILL, MOHR und ZAGEL, 5) fanden HERROLD und DUNHAM (6) bei Wiederholung der Versuche in geringerem Prozentsatz Tumoren der Nebenhöhlen, transplantable Lebercarcinome sowie Nierentumoren. Die Applikationsform des DÄNA - Inhalation, Magensonde, rectale Applikation, subcutane Injektion - ist dabei, zumindest für die Veränderungen am Tracheobronchialsystem, unerheblich (4,5). DONTENWILL und Mitarbeiter sprechen aufgrund der spezifischen Effekte im Tracheobronchialsystem des Goldhamsters von einer organotropen Wirkung des Diäthylnitrosamins, wofür sie genetische Faktoren verantwortlich machen (7).

Es ergaben sich jedoch bedeutsame Unterschiede in der Reaktionsweise der Trachea gegenüber den kleinen und mittleren Bronchien auf das Carcinogen. Nach einmonatiger Behandlungszeit bzw. Applikation von etwa 15 mg DÄNA zeigten sich Plattenepithelmetaplasien der Trachealschleimhaut, später Papillome, welche häufig eine die Tracheallichtung obturierende Grösse erreichten und zur Erstickung der Versuchstiere führten (4). Ein infiltrierend wachsendes Trachealcarcinom wurde nur in einem Fall beobachtet.

In den kleinen und mittleren knorpelfreien Bronchien entwickelten sich mit im allgemeinen geringer Verzögerung gegenüber den Trachealveränderungen und mit quantitativen Schwankungen je nach Applikationsart Basalzellhyperplasien, Metaplasien verschiedener Grade meist vom Typ des Übergangsepithels und schliesslich

infiltrierend wachsende Carcinome, die vereinzelt schon nach dreimonatiger Behandlung zur Beobachtung kamen.

Durch Stop-Versuche (5) und Kerngrössenmessungen (8) versuchten DONTENWILL und MOHR genauere Anhaltspunkte für die Dignität der Metaplasien der Tracheobronchialschleimhaut zu erhalten. Bei Behandlungsstop nach 1, 2 und 3 Monaten und einer weiteren Überlebenszeit der Tiere von 2 bis 4 Monaten war keine Rückbildung der Metaplasien zu verzeichnen. Die Autoren räumen diese Möglichkeit mit ALTMANN u. Mitarbeitern (9) höchstens in Bezug auf die Basalzellhyperplasie ein.

Vergleichende Kerngrössenmessungen an normalen und metaplastischen Tracheal- und Bronchialepithelien sowie an infiltrierend wachsenden Bronchialcarcinomen des Goldhamsters ergaben für die Metaplasien und Carcinome zwar eine breitere Streuung der Werte und eine Verschiebung des Häufigkeitsgipfels in Richtung auf die grösseren Kerne, jedoch war ein signifikanter Unterschied zwischen den Tracheal- und Bronchialmetaplasien sowie den Carcinomen nicht feststellbar.

Das Fehlen eindeutiger Kriterien zur Unterscheidung leichter benignen von potentiell malignen Metaplasien veranlassten SANDRITTER, SEIDEL, KLEINHANS, PADDAGS und DONTENWILL (10) zu cytophotometrischen Untersuchungen am gleichen Tiermaterial. Für die normale Tracheal- und Bronchialschleimhaut ergaben sich in Übereinstimmung mit autoradiographischen Untersuchungen von MAURER u. KOBURG (11) diploide DNS-Werte. Die Trachealpapillome zeigten eine enge Gruppierung der cytophotometrischen Messwerte um den diploiden Bereich und eine geringe um den tetraploiden, wobei es sich wahrscheinlich um DNS-synthetisierende Zellen handelt. Beim Übergangsepithel der cancerisierten Bronchialschleimhaut ergab sich ausser einem gelegentlich schwach ausgeprägten tetraploiden Gipfel kein wesentlicher Unterschied. Lediglich bei vermehrtem Auftreten von Zellatypien lokalisierten sich mehr Zellen zwischen dem diploiden und tetraploiden Bereich jedoch ohne Ausbildung eines aneuploiden Gipfels im Sinne einer Stammlinie. Die DNS-Werte zwischen 2c und 4c können nach Ansicht der Autoren ebenfalls auf DNS-synthetisierende Zellen bezogen werden. Das gleiche DNS-Verteilungsmuster wie bei den Metaplasien fand sich auch bei den infiltrierend wachsenden Carcinomen. Die Zellkerne dieser experimentell erzeugten Carcinome beim Goldhamster unterscheiden

sich in ihrer DNS-Verteilung grundsätzlich nicht vom normalen Bronchialepithel, lediglich die Streuung der Messwerte kann grösser sein.

Die erwähnten Untersuchungen gaben also keinen näheren Aufschluss über die Dignität der einzelnen Stadien der Metaplasie. Mit der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, die Schleimhautveränderungen mit Hilfe der Autoradiographie zu untersuchen. Eine Fülle von Arbeiten existieren bereits über autoradiographische Untersuchungen an anderen cancerisierten Wechselgeweben, insbesondere der Haut mit dem Vorteil der freien Beobachtungsmöglichkeit des Testobjekts.

In mancher Hinsicht interessant sind die Beobachtungen von OEHLERT, COTÉ und BÜCHNER (12) an der mit Methylcholanthren gepinselten Mäusehaut, da hier den Trachealveränderungen des Goldhamsters ähnliche Plattenepithelmetaplasien und Papillome entstehen. Es zeigte sich, dass DNS-synthetisierende, teilungsfähige oder intermitotische Zellen in der normalen Haut, bei der Hyperplasie und auch in regelmässig gebauten Papillomen nur in der Basalschicht zu finden sind. Erst bei fortschreitender Cancerisierung dringen sie in den sogenannten Retikulierungszonen in höhere Epithellagen vor. Jedoch ist die Zahl der DNS-synthetisierenden Zellen pro Gesamtzellzahl (^3H -Index) in den Retikulierungszonen und den Carcinomen etwa gleich hoch. Es wird zu zeigen sein, dass hier grosse Ähnlichkeiten mit dem Bronchialcarcinom des Goldhamsters bestehen.

II. Aufgabenstellung.

Die von DONTENWILL und Mitarbeitern (4,5,7) beobachtete unterschiedliche Reaktion von Tracheal- und Bronchialschleimhaut des Goldhamsters während der Carcinogenese durch Diäthylnitrosamin war der Anlass für die vorliegende Arbeit. Wie schon erwähnt, entstehen nach DÄNA-Applikation in der Trachea Plattenepithelmetaplasien und Papillome, jedoch nur sehr selten Carcinome, wogegen die Bronchialschleimhaut mit Metaplasien verschiedenen Grades und infiltrativ wachsenden Carcinomen reagiert.

Mit Hilfe der Autoradiographie durch tritiummarkiertes Thymidin wird versucht, Aufschluss darüber zu erhalten, ob eine primär unterschiedliche Zellneubildungsrate der verschiedenartigen Reaktion der beiden anatomisch sehr ähnlich gebauten Abschnitte des Respirationstraktes zugrunde liegt oder ob andere für dieses Phänomen relevante autoradiographisch fassbare Vorgänge während der Carcinogenese erkennbar sind.

Gleichfalls wird geprüft, ob die cytologisch und cytophotometrisch nicht unterscheidbaren proliferierenden Bronchialmetaplasien und Bronchialcarcinome unterschiedliche autoradiographische Merkmale aufweisen.

III. Methodik.

a. Theoretische Erläuterungen.

Mit der Autoradiographie durch tritiummarkiertes Thymidin (^3H -Thymidin) ist uns eine Methode in die Hand gegeben, welche genaueren Einblick in den Stoffwechsel der Desoxyribonucleinsäure (DNS) gestattet. Thymidin ist ein selektiver Vorläufer der DNS (13,11,14,15) und wird nur während einer zeitlich eng begrenzten Phase von 6 - 8 Stunden in den Zellkern eingebaut (11,14,16). Ausserhalb dieser sogenannten DNS-Synthesephase oder S-Phase unterliegt die Desoxyribonucleinsäure keinem Stoffwechsel (17).

Dieser Umstand gestattet es, diejenigen Zellen autoradiographisch zu erfassen, die sich in der Chromosomenverdoppelungsphase befinden. Die DNS-synthetisierenden Zellen liegen bei normalen Wechselgeweben wie Haut und Tracheobronchialschleimhaut ausschliesslich in der Basalzellschicht. Nach einer Mitose verbleibt eine Tochterzelle - die sogenannte intermitotische - in der Basalschicht, der Indifferenzzone, während die zweite - die sogenannte postmitotische - Tochterzelle zur Oberfläche wandert und hierbei eine Wachstums- und Differenzierungsphase durchläuft. Die in der Indifferenzzone verbleibende Zelle durchläuft ebenfalls eine Wachstums- und Differenzierungsphase (G_1 -Phase) von je nach Gewebe wechselnder Länge, an deren Ende sich die DNS-Synthesephase anschliesst, welche durchschnittlich 6 - 8 Stunden dauert. Darauf folgt die prämitotische Ruhephase, die je nach Gewebe unterschiedlich lang ist, aber offenbar auch in schnell regenerierenden Gewe-

ben und in Carcinomen 40 Minuten nicht unterschreitet (16,12). Die anschliessende Mitosezeit wird mit 60 Minuten angegeben, kann sich aber bei Carcinomen offensichtlich auf die Hälfte verkürzen (16). In Abb. 1 ist der Generationscyclus einer intermitotischen Zelle schematisch wiedergegeben.

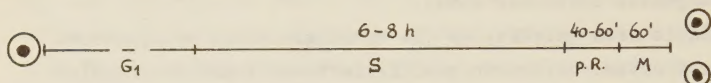


Abb.1: Schematische Darstellung des Generationscyclus einer intermitotischen Zelle. G₁ = Wachstums- und Differenzierungszeit. S = DNS-Syntheseseit. p.R. = prämitotische Ruhezeit. M = Mitosezeit.

Intraperitoneal injiziertes Thymidin in der üblichen Dosierung von 2 uC/ Gramm Körpergewicht hat im tierischen Organismus eine Verfügbarkeitszeit von 40 - 60 Minuten. Nach dieser Zeit ist kein frei verfügbares Thymidin mehr nachweisbar (11). Werden die Versuchstiere 40 - 60 Minuten nach Injektion von ³H-Thymidin getötet, so sind diejenigen Zellen markiert, die sich während dieser Zeit in der DNS-Synthesephase befunden haben. Dies lässt sich durch Übersichten der histologischen Schnitte mit flüssiger Photoemulsion (Ilford) oder Strippingfilm darstellen. Nach Exposition in der Dunkelkammer, Entwicklung und Fixation zeigen sich über den Zellkernen, die sich während der Thymidinverfügbarkeitszeit in der DNS-Synthesephase befunden haben, Schwärzungspunkte. Sie werden durch die aus dem zerfallenden Tritium freierwerdenden β -Teilchen hervorgerufen. Die β -Strahlung besitzt eine Reichweite von ca 2 u (18).

Die Zahl DNS-synthetisierender Zellen dividiert durch die Gesamtzellzahl einer Population ergibt den Markierungsindex (³H-Index). Es gilt folgende Beziehung:

$$^3\text{H-Index} = \frac{\text{Zahl d. mark. Zellen}}{\text{Gesamtzellzahl}} = \frac{\text{Dauer d. DNS-Synthese}}{\text{Lebensdauer d. Zellen}}$$

Die Proliferationsgrösse eines Gewebes kann aus dem

$$\text{Mitoseindex} = \frac{\text{Zahl der Mitosen}}{\text{Gesamtzellzahl}}$$

bestimmt werden. Dieses Verfahren eignet sich besonders dann nicht, wenn die Mitosezahl sehr gering ist wie in normaler Tracheal- und Bronchialschleimhaut. Da die Mitosezeit nur etwa 1/8 der DNS-

Synthesezeit beträgt, werden durch ^3H -Markierung achtmal mehr Zellen erfasst als durch Auszählung der Mitosen, wodurch die Fehlerbreite entsprechend niedriger ausfällt.

Aus der Markierung einer Zelle allein kann allerdings nichts über den weiteren Verlauf des Generationscyclus gesagt werden. An die DNS-Verdoppelung kann sich eine Mitose, eine Amitose oder eine weitere DNS-Synthese ohne zwischengeschaltete Mitose anschliessen (14). Bei einer Zellpopulation, welche nur diploide Kerne besitzt, wie das vorliegende Untersuchungsmaterial, ist jedoch nach einer DNS-Synthese auch eine Mitose oder Amitose zu erwarten.

Die umseitig aufgeführten Beziehungen haben nur unter der Einschränkung Gültigkeit, dass es sich um asynchron wachsende Zellpopulationen handelt. Es ist bekannt, dass die meisten Gewebe eine tageszeitliche Rhythmik der DNS-Synthese und Mitose aufweisen (MONTAGNA, 19), ebenso die Bronchialepithelien von Maus (KOBURG, 20) und Hamster (SCHÖPF, 23). In diesem Fall müssen tageszeitlich bedingte Schwankungen der Versuchsergebnisse durch Wahl eines stets gleichen Versuchszeitpunktes vermieden werden. Die gewonnenen Ergebnisse gelten jedoch streng genommen nur für den Versuchszeitpunkt.

b. Durchführung der Versuche.

Als Versuchstiere dienen 65 bei Versuchsbeginn etwa 2 1/2 Monate alte männliche Goldhamster. Sie wurden in Käfigen zu 5 - 10 Stück gehalten und mit Körnermischfutter und Rüben ernährt.

20 Tiere erhielten 2x wöchentlich 0,4 ml einer wässrigen Lösung von Diäthylnitrosamin (1:250), also pro Applikation 1,6 mg DÄNA rectal mit Hilfe eines Ureterenkatheters, welcher mehrere Zentimeter weit eingeführt werden musste, um einen Reflux der Substanz zu verhindern.

40 Tiere erhielten wöchentlich 2 subcutane Injektionen von 0,5 ml DÄNA (1:250) in ebenfalls wässriger Lösung, also pro Injektion 2 mg DÄNA.

5 Tiere wurden in einen Stop-Versuch genommen und erhielten während einer Woche 2 subcutane Injektionen von 0,5 ml DÄNA in gleicher Verdünnung, insgesamt 4 mg DÄNA. Sie wurden erst 324 Tage nach der letzten Injektion untersucht.

Die Kontrollgruppe bildeten 20 unbehandelte männliche Goldhamster gleichen Alters.

Um die verschiedenen Stadien der Schleimhautveränderungen im Tracheobronchialsystem untersuchen zu können, erfolgte die Autoradiographie nach unterschiedlichen Behandlungszeiten, bei den rectal behandelten Tieren zwischen dem 24. und 112., bei den Tieren, welche Subcutaninjektionen erhalten hatten, zwischen dem 88. und 133. Behandlungstag.

Um tageszeitlich bedingte Schwankungen der Ergebnisse zu vermeiden, wurde die Autoradiographie jeweils zum gleichen Zeitpunkt morgens um 8 Uhr durchgeführt. Die Tiere erhielten ^3H -Thymidin der Fa. Schwarz Bioresarch mit einer spezifischen Aktivität von 1.9 Curie/mMol in einer Verdünnung von 1:5 mit sterilem Aqua dest. intraperitoneal injiziert und zwar jeweils 2 uC/Gramm Körpergewicht. 40 Minuten nach der Injektion wurden die Tiere in Äthernarkose getötet. Trachea und Lunge wurden in neutral gepuffertem 4%igem Formaldehyd fixiert. Die Einbettung der Präparate erfolgte in der üblichen Weise in Paraffin.

Von der Lunge wurden frontale, von der Trachea zwischen Kehlkopf und Bifurkation horizontale Stufenschnitte von 5 u Dicke angefertigt und nach Übersichtung mit flüssiger Photoemulsion (Ilford G5 bzw. K2) 7 bzw. 14 Tage in der Dunkelkammer exponiert. Die 14 tägige Exposition diente lediglich einer deutlicheren Markierung der Zellen. Es zeigte sich jedoch, dass auch eine 7 tägige Exposition voll ausreichend ist. Nach Entwicklung und Fixation erfolgte die Färbung der Schnitte durch die Emulsionsschicht hindurch mit Hämalaun-Eosin.

Ausgewertet wurden sowohl die 7 als auch die 14 Tage exponierten Präparate. Die Bestimmung des ^3H -Index erfolgte an der Trachealschleimhaut jeweils zwischen Kehlkopf und Bifurkation sowie an der Schleimhaut der knorpelfreien kleineren und mittleren Bronchien. Als markiert galten alle Zellen mit mindestens 5 Silberkörnern über dem Kern. Zur Bestimmung des normalen Markierungsindex wurden

bei jedem der 20 Kontrolltiere je 2000 Zellen der Tracheal- und Bronchialschleimhaut fortlaufend ausgezählt. Tiere mit histologisch erkennbaren entzündlichen Veränderungen des Tracheobronchialsystems wurden nicht verwertet. Aus sämtlichen Werten wurde ein mittlerer Markierungsindex berechnet.

Bei den Versuchstieren richtete sich die Zahl der ausgezählten Zellen nach der Grösse der in den Stufenschnitten gefundenen metaplastischen bzw. carcinomatösen Veränderungen und musste daher von Tier zu Tier unterschiedlich ausfallen. Bei Vorliegen mehrerer gleichartiger morphologischer Veränderungen (z.B. mehrere proliferierende Metaplasien oder mehrere kleine Carcinome) mit jeweils nur geringen Zellzahlen bei ein und demselben Tier wurden die ausgezählten Werte subsummiert, um eine repräsentative Zellzahl zu erreichen, und ein gemeinsamer Index berechnet.

Die Tabellen 1 - 3 geben die wichtigen Daten und sämtliche Indices wieder. Gleichartige morphologische Veränderungen wurden gruppenweise zusammengestellt. Zur Berechnung des mittleren Markierungsindex jeder Gruppe wurde die Summe der markierten Zellen durch die Summe der ausgezählten Zellen dividiert. In Anbetracht der von Tier zu Tier sehr unterschiedlich grossen metaplastischen bzw. carcinomatösen Veränderungen schien dieses Verfahren gegenüber der einfachen Mittelung der Indices das genauere zu sein.

Neben der Indexberechnung wurde bei allen Tieren die Lokalisation der markierten Zellen innerhalb der normalen und der metaplastischen Schleimhaut sowie innerhalb der Carcinome beachtet.

IV. Ergebnisse.

Während der Versuchsdauer von 24 bis 133 Tagen wurden wie früher schon von DONTENWILL und MOHR beschrieben (4) folgende morphologische Veränderungen am Tracheobronchialsystem gefunden: In der Trachea entstanden bereits nach kurzer Zeit umschriebene Plattenepithelmetaplasien mit mehreren Epithellagen ohne Verhornung. Schon nach 24 Tagen wurde in einem Fall ein beginnendes Papillom beobachtet. Nach 87 Tagen waren bereits grosse, die Tracheallichtung stark stenosierende verzweigte Papillome vorhanden. Die einzelnen Verzweigungen besonders der grossen Papillome variieren ausser-

ordentlich stark in der Höhe ihres Epithels. Teilweise finden sich über dem meist gefäßreichen Grundstück 2 bis 3, an anderen Stellen 6 und mehr Epithellagen (Abb. 2). Es handelt sich hierbei ausschließlich um nichtverhornendes Plattenepithel.

In den kleinen und mittleren knorpelfreien Bronchien wurden bereits nach 40 tägiger Behandlung mit DÄNA Metaplasien und nach 90 Tagen infiltrierend wachsende Carcinome beobachtet. Die meist flächenhaften Metaplasien zeigen nur selten ausgereiftes Plattenepithel wie in der Trachea. Meist bestehen sie aus Übergangsepithel ohne Ausdifferenzierung mit unterschiedlichen Zell- und Kernformen in den einzelnen Schichten. Daneben finden sich auch stellenweise Basalzellhyperplasien. Retikulierungszonen bestehend aus schmalen spindeligen Zellen, wie sie an der cancerisierten Mäusehaut (12) oder bei strahleninduzierten Bronchialmetaplasien der Ratte (9) auftreten, wurden nicht beobachtet.

Die Carcinome entstanden meist multipel an den Orten proliferierender Metaplasien, also ebenfalls an kleinen und mittleren Bronchien. Bei beginnender Invasion beobachtet man unscharfe Abgrenzungen der Basalzellschicht gegen die Submucosa. Der Durchbruch der Carcinome erfolgt an umschriebener Stelle, nicht diffus. Die Carcinomzellen unterscheiden sich in Größe, Form und Chromatindichte nicht sichtbar von denen der proliferierenden Metaplasien, stellen also den Typ der Übergangsepithelzellen dar. Nur in einem Fall wurde ein nicht verhornendes Plattenepithelcarcinom beobachtet.

Die morphologischen Veränderungen der Bronchialschleimhaut nach DÄNA-Behandlung wurden folgendermaßen unterteilt und autoradiographisch getrennt ausgewertet:

1. Leichte Metaplasie: Geringe Vermehrung der Zellagen auf 2-3. Erkennbare Veränderungen in Zellgröße und -form (Polymorphie).
2. Mittelgradige Metaplasie: Vermehrung der Zellagen auf 4. Deutliche Zell- und Kernatypien.
3. Proliferierende Metaplasie: Flächenhafte zottige polymorphe Epithelproliferationen mit starker Zunahme der Zellschichten auf 5-6. Zell- und Kernpolymorphie. Vacuolige Plasmadegenerationen

4. Hochgradig proliferierende Metaplasie: Flächenhafte polymorphe papilläre Epithelproliferationen mit starker Einnistung des Bronchiallumens.

5. Carcinom: Invasives Wachstum. Zell- und Kernpolymorphie.

Die Markierungsindices der normalen Trachealschleimhaut sowie der durch DÄNA-Behandlung hervorgerufenen Veränderungen sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Die entsprechenden Werte für die Bronchien finden sich in Tabelle 3. Die Normalwerte stellen jeweils das Mittel von 40 000 bei 20 Kontrolltieren ausgezählten Zellen dar.

In der normalen Trachealschleimhaut beträgt der Markierungsindex im Mittel 5,6‰, der niedrigste und höchste Einzelwert 0 bzw. 12 ‰.

Das Bronchialepithel unbehandelter Kontrolltiere weist dagegen einen wesentlich niedrigeren Markierungsindex auf, nämlich 0,85‰. Die Streubreite liegt hier zwischen 0 und 4 ‰. Sowohl am Tracheal- wie am Bronchialepithel der Kontrolltiere sind ausschliesslich Basalzellen markiert (Abb 2a).

Bei den Plattenepithelmetaplasien und Papillomen der Trachea liegen die markierten Zellen in der überwiegenden Mehrzahl in der Basalschicht, teilweise aber auch in der Parabasalschicht und vereinzelt in höheren Zellagen (Abb. 2b, 3b). Dabei sind die Zellkerne jedoch ziemlich regelmässig, das Stratum spinosum allerdings nicht so deutlich ausgebildet wie bei der äusseren Haut. Der Markierungsindex steigt gegenüber den Normalwerten steil an und zwar bei den Metaplasien bereits auf 40 ‰. Die Papillome weisen mit 38 ‰ einen leicht, jedoch nicht signifikant niedrigeren Index auf. Lediglich die Schwankungsbreite ist grösser und dies auch nur in einem von 30 Fällen. Die Indexsteigerung gegenüber der Normalschleimhaut beträgt bei den Trachealmetaplasien und Papillomen das 7 bis 8 fache.

Ein völlig anderes Bild bietet sich jedoch bei den 5 Tieren des Stop-Versuchs (Tab.2), die erst 324 Tage nach Verabfolgung von 4 mg DÄNA untersucht wurden. Morphologisch unterscheiden sich die Trachealveränderungen nicht von denen der übrigen Versuchstiere. Es fanden sich in 4 Fällen grosse, die Tracheallumina stenosierende Papillome und in einem Fall ein kleines Papillom. Sehr überraschend ist jedoch der niedrige ³H-Index. Er beträgt mit 10 ‰ nur die Hälfte der bei den übrigen Tieren gefundenen Werte. In

zwei Fällen lag er mit 5 und 4 %o noch unter dem Index der normalen Trachealschleimhaut. Die markierten Zellen befinden sich ausschliesslich in der Basalschicht.

Bei den leichten Metaplasien der Bronchialschleimhaut, welche 2 - 3 Zellagen aufweisen, steigt der Markierungsindex gegenüber der Normalschleimhaut bereits stark an und zwar auf durchschnittlich 30 %o. Die markierten Zellen liegen hier ausschliesslich in der Basalschicht. Eine 67 fache Steigerung des Index erreichen die mittelgradigen Metaplasien gegenüber der Norm mit einem Index von 57 %o. Die markierten Zellen liegen nicht mehr ausschliesslich in der Basalschicht sondern auch schon in höheren Zellagen (Abb.4a). Eine nur graduelle Änderung ist bei den stärker proliferierenden zottigen Metaplasien zu verzeichnen. Markierte Zellen finden sich jetzt in allen Schichten, jedoch immer noch überwiegend in den unteren Epithellagen (Abb. 4b). Das Epithel ist in der Regel scharf gegen die Submucosa abgegrenzt. An umschriebenen Stellen finden sich jedoch Durchbrüche und Infiltrationen in die Umgebung ohne erkennbare Änderung der Zellmorphie.

Im Bereich dieser beginnenden Carcinome (Abb.5) steigt der Markierungsindex nicht weiter an. Die Carcinome weisen insgesamt keinen höheren durchschnittlichen Markierungsindex auf als die proliferierenden Metaplasien, er liegt im Gegenteil mit 50 %o noch unter dem der proliferierenden Metaplasien mit 54 %o. Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant. In den kleinen Carcinomen sind die markierten Zellen diffus verteilt, während sie sich in den grossen Carcinomen vorwiegend in den gut vascularisierten Randzonen finden. Die zentralen Carcinomabschnitte sind häufig völlig frei von markierten Zellen. Da bei den grossen Carcinomen die Zellauszählung in diagonalen Streifen erfolgte, mithin auch ausgedehnte unmarkierte Zentren erfasst wurden, war in diesen Fällen ein niedrigerer Markierungsindex die Folge. Dadurch findet auch der gegenüber den Metaplasien niedrigere Mittelwert seine Erklärung.

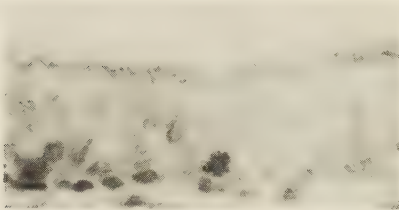
Tabelle 1

Vers.-Nr.	Trachealveränderung	Ausge- zählte Zellen	Markierte Zellen	3H-Index ‰	Behandl.	Beh. dauer Tage	Ges. Dosis mg
2403-2422 (20 Tiere)	normal	je 2000	je 1000 5,6 ⁺⁸ -5,6	5,6	-	-	-
2230	beginnendes Papillom	574	21	37	DANA rect	24	9,6
2318	kleines Papillom	2157	78	36	DANA rect	95	43,2
2320	kleines Papillom	1772	94	53	DANA rect	95	43,2
2333	beginnendes Papillom	1466	63	43	DANA rect	87	38,4
2346	grosses Papillom	2139	85	40	DANA rect	112	51,2
2354	grosses Papillom	2209	133	60	DANA rect	87	38,4
2491	kleines Papillom	7128	193	27	DANA subc	88	50
2492	gr. u. kl. Papillome	5102	152	29	DANA subc	88	50
2493	kleine Papillome	6404	206	30	DANA subc	88	50
2494	kleine Papillome	2093	70	33	DANA subc	88	50
2495	grosses Papillom	2373	175	75	DANA subc	88	50
2496	grosses Papillom	2044	147	75	DANA subc	88	50
2543	kleines Papillom	2000	65	33	DANA subc	121	68
2544	kleines Papillom	2000	45	23	DANA subc	121	68
2545	grosses Papillom	2022	52	25	DANA subc	121	68
2546	grosses Papillom	2000	76	38	DANA subc	121	68
2547	grosses Papillom	2036	41	21	DANA subc	121	68
2548	grosses Papillom	2113	49	23	DANA subc	121	68
2564	grosses Papillom	2056	50	24	DANA subc	133	76
2566	kleines Papillom	2136	75	35	DANA subc	133	76
2567	gr. u. kl. Papillome	2011	76	38	DANA subc	133	76
2568	kleines Papillom	2037	50	25	DANA subc	133	76
2569	grosses Papillom	2133	79	37	DANA subc	133	76
2570	kleines Papillom	2105	170	163	DANA subc	133	76
2571	kleines Papillom	1051	64	61	DANA subc	133	76
2572	kleines Papillom	134	5	37	DANA subc	133	76
2573	grosses Papillom	2062	49	27	DANA subc	133	76
2574	grosses Papillom	2062	56	27	DANA subc	133	76
2575	grosses Papillom	2050	122	60	DANA subc	133	76
2576	grosses Papillom	2101	82	39	DANA subc	133	76
		69580	2623	M:38 ⁺¹²¹ - 21			
2543	Metaplasie	1068	38	35	DANA subc	121	68
2544	"	2000	65	34	" "	121	68
2546	"	1016	37	37	" "	121	68
2567	"	1026	19	19	" "	133	76
2571	"	1540	73	47	" "	133	76
2566	"	933	1	12	" "	133	76
2569	"	1147	24	21	" "	133	76
2572	"	1018	70	69	" "	133	76
2547	"	1060	38	36	" "	124	70
2496	"	825	44	53	" "	90	50
2495	"	1257	86	69	" "	90	50
2493	"	1069	54	51	" "	90	50
2492	"	846 ⁿ	52	61	" "	90	50
		14805	629	M:41 ⁺²⁸ -21			

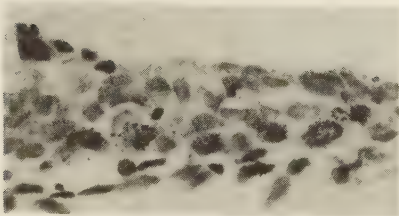
Tabelle 2: Stop-Versuche

Vers.-Nr.	Trachealveränderung	Ausge- zählte Zellen	Markierte Zellen	3H-Index ‰
2348	kleines Papillom	2201	76	35
2349	grosses Papillom	2040	37	18
2350	grosses Papillom	2154	43	20
2356	grosses Papillom	6070	22	4
2357	grosses Papillom	4009	20	5
		<u>10474</u>	<u>198</u>	M:19 ⁺¹⁶ -15

Zu Tab. 2: Nach s.c.-Applikation von 2x 2mg DÄNA innerhalb einer Woche erfolgte Behandlungsstop bei allen Tieren. Die autoradiographische Untersuchung erfolgte nach 324 Tagen.



a



b

Abb. 2a: Normale Trachealschleimhaut mit regelmässiger Schichtung des Epithels und einer markierten Basalzelle.

Abb. 2b: Mittelgradige Metaplasie des Trachealepithels. Starke Zunahme markierter Zellen vorwiegend basal.

Tabelle 3

Vers.-Nr.	Bronchialveränderung	Ausge- zählte Zellen	Markierte Zellen	3H-Index ‰	Behandl.	Beh. dauer Tage	Ges. Dosis mg
2403-2422 (20 Tiere)	normal	je 2000	je 1000 0,85 ^{+3,15} -0,85	0,85	-	-	-
2320	kleine Carcinome	4376	247	58	DÄNA rect	95	43,2
2493	kleine Carcinome	991	33	33	DÄNA subc	90	50
2544	gr. u. kl. Carcinome	2225	122	55	DÄNA subc	121	68
2548	kleine Carcinome	1175	80	68	DÄNA subc	121	68
2564	gr. u. kl. Carcinome	2241	83	38	DÄNA subc	133	76
2569	grosses Carcinom	1025	32	31	DÄNA subc	133	76
2570	kleine Carcinome	1108	37	33	DÄNA subc	133	76
2572	kleine Carcinome	1035	93	90	DÄNA subc	133	76
		14176	727	M:50 ⁺⁴⁰ -19			
2318		935	70	75	DÄNA rect	95	43,2
2320	stark proliferieren- de Metaplasien	2097	126	58	DÄNA rect	95	43,2
2548		1992	78	39	DÄNA subc	121	68
2569		1221	81	71	DÄNA subc	133	76
2544		1002	51	51	DÄNA subc	121	68
		7247	406	M:56 ⁺¹⁹ -17			
2266		1877	120	63	DÄNA rect	40	17,6
2267		480	76	158	DÄNA rect	40	17,6
2265	proliferierende Metaplasie	2588	258	99	DÄNA rect	40	17,6
2564		1043	39	37	DÄNA subc	133	76
2567		1000	50	50	DÄNA subc	133	76
2570		2147	50	23	DÄNA subc	133	76
2493		6581	249	38	DÄNA subc	88	50
		15716	842	M:54 ⁺¹⁰⁴ -31			
2231		1180	106	90	DÄNA rect	24	9,6
2259		1415	118	41	DÄNA rect	40	17,6
2494		793	20	25	DÄNA subc	88	50
2495		2635	160	61	DÄNA subc	88	50
2496	mittelgradige Metaplasie	865	39	45	DÄNA subc	88	50
2545		1066	35	33	DÄNA subc	88	50
2547		239	10	41	DÄNA subc	88	50
2566		635	22	35	DÄNA subc	133	76
2568		369	20	54	DÄNA subc	133	76
2571		266	11	41	DÄNA subc	133	76
2573		724	41	57	DÄNA subc	133	76
		10187	582	M:57 ⁺³³ -32			
2574		1437	26	18	DÄNA subc	133	76
2776		2008	44	22	DÄNA subc	133	76
2543	leichte Metaplasie	510	6	12	DÄNA subc	121	68
2260		1017	17	17	DÄNA rect	40	17,6
2491		962	84	90	DÄNA subc	88	50
2575		78	1	13	DÄNA subc	133	76
		6014	180	M:30 ⁺⁶⁰ -18			

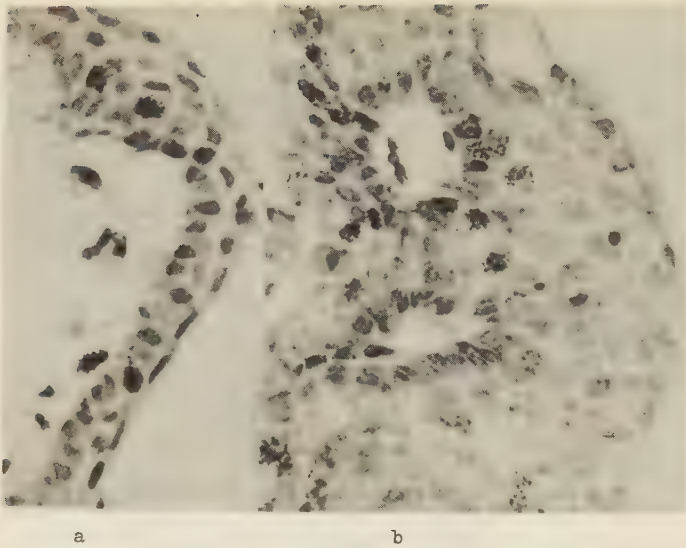


Abb. 3: Ausschnitte von Trachealpapillomen mit schmaler (a) und breiter Epithellage (b). Relativ hoher Markierungsindex. Vorwiegend Basalzellen markiert. (Vergr. 400 x)

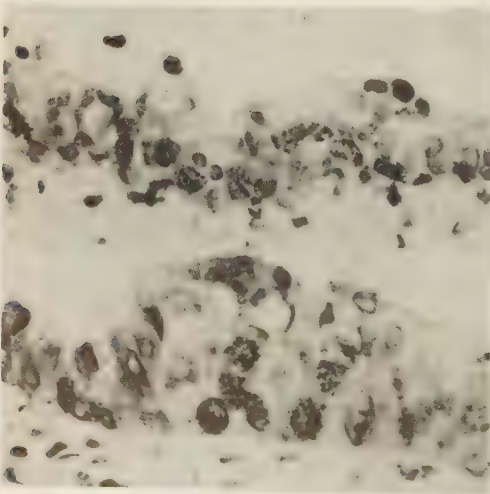


Abb. 4a: Mittelgradige Metaplasie der Bronchialschleimhaut mit vorwiegender Markierung basaler Zellen (Vergr. 400 x)

Abb. 4b: Proliferierende Metaplasie der Bronchialschleimhaut. Markierte Zellen in verschiedenen Lagen des proliferierten Epithels. (Vergr. 400 x)

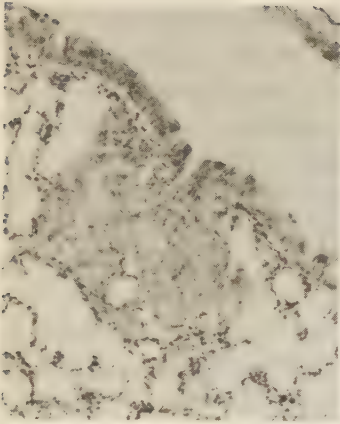


Abb. 5: Kleines Carcinom. Durchbruch an umschriebener Stelle im Bereich einer Schleimhautmetaplasie eines kleinen Bronchus. Keine Vermehrung markierter Zellen an der Durchbruchstelle (Vergr. 100 x).

V. Diskussion.

Die Proliferation der Tracheal- und Bronchialschleimhaut unter Einwirkung von Diäthylnitrosamin kann theoretisch auf zwei Wegen zustande kommen: Entweder durch Verlängerung der Lebensdauer der postmitotischen Zellen bei gleichbleibender Mitosehäufigkeit der intermitotischen Zellen oder durch Verkürzung der Wachstums- und Differenzierungszeit der intermitotischen Zellen bei gleichbleibender Lebensdauer der postmitotischen Zellen. Einen Anhaltspunkt für die zweite Möglichkeit gewinnen wir aus dem steil ansteigenden ^3H -Index bei den Metaplasien und Papillomen gegenüber der Normalschleimhaut. Der ^3H -Index ist jedoch nur dann ein relativ genaues Mass für die Proliferationssteigerung eines Gewebes, wenn

sich die DNS-Synthesephase im Laufe der Cancerisierung nicht ändert und

auf jede DNS-Synthese eine Mitose folgt.

Die Bestimmung der DNS-Synthesezeit mit der " ^3H -markierte-Mitosen-Methode" (11) konnte am vorliegenden Untersuchungsmaterial nicht durchgeführt werden, da hierzu mehrfache Gewebsentnahmen am gleichen Tier in zeitlichen Abständen erforderlich gewesen wären. Auch der Mitoseindex liess sich wegen der Colchicinresistenz der Tiere nicht

bestimmen. Ohne Anwendung der Colcemidmethode würde jedoch die Fehlerbreite viel zu hoch. Da der Mitoseindex etwa $1/8$ des ^3H -Index beträgt, bestünde die Chance, in der normalen Bronchialschleimhaut unter 10000 Zellen eine markierte Mitose zu finden.

Aus den Beobachtungen von DÖRMER, TULINIUS und OEHLERT (16) an der durch Methylcholanthrenpinselung cancerisierten Mäusehaut geht jedoch hervor, dass die S-Phase bei den Metaplasien, Papillomen und Carcinomen gleich lang ist, woraus die Autoren folgern, dass die gesteigerte Zellproliferation auf eine Verkürzung der G_1 -Phase der intermitotischen Zellen zurückzuführen ist. Dabei ist die Lebensdauer der postmitotischen Zellen keinen Veränderungen unterworfen.

Die zweite Voraussetzung, nämlich dass auf jede DNS-Synthese eine Mitose folgt, wird durch die Ergebnisse von SANDRITTER und Mitarbeitern (10) erhärtet, die an der normalen und metaplastischen Tracheobronchialschleimhaut sowie an den Carcinomen des Goldhamsters fast ausschliesslich diploide Chromosomensätze gefunden haben.

Es darf daher angenommen werden, dass die durch Diäthylnitrosamin erzeugten Veränderungen an der Tracheobronchialschleimhaut des Goldhamsters wesentlich auf eine Verkürzung der G_1 -Phase zurückzuführen sind.

Die Schleimhautproliferationen finden sich unter DÄNA-Einwirkung diffus im gesamten Tracheobronchialsystem, sind jedoch in ihrer morphologischen Ausprägung sehr unterschiedlich. Während in der Trachea multiple Papillome entstehen, finden sich in den Bronchien flächenhafte Metaplasien zunehmender Schweregrade und schliesslich infiltrierend wachsende Carcinome. Durch die zunehmend unscharfe Begrenzung der Indifferenzonen in den Metaplasien und den Nachweis DNS-synthetisierender Zellen in immer höheren Epithelschichten wird die steigende Entdifferenzierung der Zellen deutlich. Diese Entdifferenzierung wie auch der starke Anstieg des Markierungsindex sind jedoch zumindest in den frühen Stadien der Metaplasie noch reversibel wie die an Trachealpapillomen bei Stop-Versuchen erhobenen Befunde zeigen. Diese Papillome zeigten nach Absetzen des Carcinogens scharf begrenzte Indifferenzonen und einen sehr niedrigen Markierungsindex. DNS-synthetisierende Zellen waren ausschliesslich auf die Basalzellschicht beschränkt. Ob dies auch für verschiedene Metaplasien der Bronchialschleimhaut zutrifft, konnte infolge eines technischen Fehlers nicht geprüft werden.

Das autoradiographische Bild der Tracheobronchialschleimhaut während der Behandlung mit Diäthylnitrosamin kann folgendermassen charakterisiert werden: Der Markierungsindex steigt mit Beginn der Bronchialmetaplasien steil an und erhöht sich auch im voll ausgebildeten Carcinom nicht weiter. In proliferierenden Metaplasien sind teilungsfähige Zellen in allen Epithelschichten lokalisiert. Dies trifft für die Metaplasien und Papillome der Trachea nur in sehr geringem Masse zu, jedoch ist hier der ^3H -Index fast ebenso hoch wie in den Carcinomen.

Die Trachealpapillome zeigen einen der äusseren Haut ähnlichen Aufbau und gleichen den durch Methylcholanthrenpinselung der Haut erzeugbaren Papillomen (12). Die von OEHLERT, COTÉ und BÜCHNER als Initialstadien der Carcinome angesehenen Retikulierungszonen mit starkem Anstieg des Markierungsindex konnten weder an den Trachealpapillomen noch an den Bronchialmetaplasien beobachtet werden.

Den im vorigen Kapitel dargestellten Befunden entsprechend muss die eingangs aufgeworfene Fragestellung folgendermassen beantwortet werden:

1. Die normale Trachealschleimhaut hat einen deutlich höheren ^3H -Markierungsindex und damit auch einen höheren Proliferationsindex als die Bronchialschleimhaut.
2. Die Carcinome der kleinen und mittleren Bronchien entstehen somit an Orten mit normalerweise niedrigem Zellwechsel, die nichtinvasiven Trachealpapillome dagegen an Orten mit normalerweise höherer Zellproliferation. Dieser unterschiedlichen Reaktion der beiden Abschnitte des Tracheobronchialsystems dürften dispositionelle Faktoren zugrunde liegen.
3. Der Markierungsindex ist in den Metaplasien und den Carcinomen der Bronchien gleich hoch. Unterschiede sind mit cytologischen, cytophotometrischen und autoradiographischen Methoden nicht feststellbar.

VI. Zusammenfassung.

Durch Diäthylnitrosamin erzeugte papilläre Metaplasien der Trachealschleimhaut zeigen fast ausschliesslich in der Basalzellschicht eine autoradiographisch nachweisbare DNS-Synthese. Der Markierungs-

index ist etwa gleich dem der Metaplasien und Carcinome des Bronchialbaums. Die DNS-synthetisierenden Zellen der Bronchialschleimhaut liegen bei leichten Metaplasien in der Basalschicht, bei proliferierenden Metaplasien auch in höheren Zellagen. Bei kleinen Carcinomen sind sie diffus verteilt, bei grossen Carcinomen finden sie sich vorwiegend in den Randzonen. Der ^3H -Markierungsindex steigt schon bei leichten Metaplasien stark an und wird auch von proliferierenden Metaplasien und Carcinomen nicht überschritten. Das infiltrative Wachstum geht nicht mit einer weiteren Vermehrung DNS-synthetisierender Zellen einher. Die meisten Carcinome treten an Orten normalerweise niedriger Proliferationsrate (kleine und mittlere Bronchien) auf. Bei papillären Trachealmetaplasien vermindert sich die Zahl DNS-synthetisierender Zellen nach Absetzen der Carcinogenbehandlung stark.

VII. Literaturverzeichnis

1. MAGEE, P.N. and BARNES, J.M.
The Production of Malignant Primary Hepatic Tumors in the Rat by Feeding Dimethylnitrosamine.
Brit. J. Cancer 10, 114-122 (1956)
2. SCHMÄHL, D., R. PREUSSMANN u. H. HAMPERL
Leberkrebs-erzeugende Wirkung von Diäthylnitrosamin nach oraler Gabe bei Ratten.
Naturwissenschaften 47, 89 (1960)
3. DRUCKREY, H., D. SCHMÄHL, W. DISCHLER u. A. SCHILDBACH
Quantitative Analyse der experimentellen Krebserzeugung
Naturwissenschaften 10, 217-228 (1962)
4. DONTENWILL, W. u. U. MOHR
Carcinome des Respirationstractus nach Behandlung von Goldhamster mit Diäthylnitrosamin.
Z. Krebsforsch. 64, 305-312 (1962)
5. DONTENWILL, W., U. MOHR u. M. ZAGEL
Über die unterschiedliche Lungen-carcinogene Wirkung des Diäthylnitrosamin bei Hamster und Ratte.
Z. Krebsforsch. 64, 499-502 (1962)
6. HERROLD, K.M. and DUNHAM, L.J.
Inductions of Tumors in the Syrian Hamster with Diethylnitrosamine.
Cancer Res. 23, 773-777 (1963)
7. DONTENWILL, W. und U. MOHR
Die organotrope Wirkung der Nitrosamine
Z. Krebsforsch. 65, 166-167 (1962)
8. DONTENWILL, W. und U. MOHR
Vergleichende Untersuchungen an metaplastischen und malignen Epithelwucherungen des Respirationstraktes im Tierexperiment
Z. Krebsforsch. 65, 168-170 (1962)
9. ALTMANN, H.W., R. LICK und E. STUTZ
Über die Histogenese strahleninduzierter (Sr^{90}) Plattenepithelcarcinome in der Rattenlunge.
1. Die Veränderungen am Bronchialepithel.
Beitr. path. Anat. 125, 403 (1961)

10. SANDRITTER, W., A. SEIDEL, D. KLEINHANS, I. PADDAGS, W. DONTENWILL

Z. Krebsforsch. 67, 69-79 (1965)
11. MAURER, W. und E. KOBURG
Autoradiographische Untersuchungen mit H_3 -Thymidin über
den zeitlichen Verlauf der DNS-Synthese bei den Epithelien
des Darms und bei anderen Zellarten der Maus.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 45, 108-112 (1961)
12. OEHLERT, W., J. COTÉ und F. BÜCHNER
Autoradiographische Untersuchungen zur Cancerisierung der
Epidermiszelle der Mäusehaut nach Methylcholanthrenpinselung
Beitr. path. Anat. 125, 280-303 (1961)
13. LEBLOND, C.P., B. MESSIER und B. KOPRIWA
Thymidine H^3 as a tool for investigation of the
renewal of cell populations.
Lab. Invest. 8, 296 (1959)
14. COTÉ, J., W. OEHLERT und F. BÜCHNER
Autoradiographische Untersuchungen zur DNS-Synthese während
der experimentellen Cancerisierung der Leberparenchymzelle der
Ratte durch Diäthylnitrosamin.
Beitr. path. Anat. 127, 450-473 (1962)
15. KOBURG, E.
Autoradiographische Untersuchungen zum Nucleinsäurestoff-
wechsel einzelner Zellarten der Lunge.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 44, 160-165 (1960)
16. DÖRMER, P., H. TULINIUS und W. OEHLERT
Untersuchungen über die Generationszeit, DNS-Syntheszeit
und Mitosedauer von Zellen der hyperplastischen Epidermis und
des Plattenepithelcarcinoms der Maus nach Methylcholanthren-
pinselung.
Z. Krebsforsch. 66, 11-28 (1964)
17. HUGHES, W.L. in STOHLMAN,
The Kinetics of Cellular Proliferation, S. 83
Grune & Stratton, New York-London (1959)
18. MAURER, W. und E. PRIMBSCH
Grösse der β -Selbstabsorption bei der $3H$ -Autoradiographie
Biochim. Biophys. Acta (Amst.) (1963)

19. MONTAGNA, W.

Intern. Rev. Cytol. I 265 (1952) zit. nach Oehlert, Coté
u. Büchner.

20. SCHÖPF, U.

Diss. München (in Vorbereitung)

Lebenslauf

Am 11. 6. 1934 wurde ich als Sohn des Dr.-Ing. Walter Wiebecke und seiner Ehefrau Martha, geb. Schröder, in Eschweiler, Kreis Aachen geboren. Die Volksschule besuchte ich in Nieder-Suchau in Oberschlesien, die höhere Schule in Teschen und nach 1945 in Weißburg/Lahn, Dortmund und Witten/Ruhr.

Nach dem Abitur begann ich im Jahre 1953 das Studium der Medizin in Göttingen, dort bestand ich 1956 auch die ärztliche Vorprüfung. Je zwei Semester des klinischen Studiums absolvierte ich in Wien, Göttingen und München. Das Staatsexamen legte ich im Februar 1960 in München ab. Nach Ableistung meiner Ausbildungszeit als Medizinalassistent in Einbeck und Singen/Hohentwiel erhielt ich am 31.3. 1962 die Bestallung als Arzt. Seit April 1963 bin ich als Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle im Pathologischen Institut der Universität München tätig.

